

谷物蛋白分离纯化方法的研究进展

Advances of isolation and purification methods in cereal protein

唐文娟 赵红清 许宙文 李程云辉

TANG Wen-juan ZHAO Hong-qing XU Zhou WEN Li CHENG Yun-hui

(长沙理工大学化学与生物工程学院, 湖南 长沙 410114)

(College of Chemical and Biological Engineering, Changsha University of Science
and Technology, Changsha, Hunan 410114, China)

摘要:谷物蛋白由于具有高度异质性、低溶解度和容易聚集等因素,导致其非常难以分离纯化和鉴定。为充分了解谷物蛋白的结构与功能,实现对谷物蛋白的分离纯化,阐述了几种常见谷物蛋白的组成及特点,对近年来国内外有关谷物蛋白的分离纯化原理与模式的研究进展进行了综合评述,同时展望今后谷物蛋白分离纯化的研究方向。

关键词:谷物蛋白;分离纯化;研究进展

Abstract: Cereal protein has been extremely difficult to purify and characterize owing to their heterogeneity, poor solubility and tendency to polymerize. In order to have a full understanding of structure and function in cereal protein, to realize the separation and purification of grain protein, the composition and characteristics of cereal proteins were introduced briefly, introduced the research progress comprehensive recitation on principle and model of the grain protein purification domestic and overseas in recent years. The future research prospects of cereal proteins were put forward as well.

Keywords: cereal protein; isolation and purification; reseach progress

无论是直接作为人类食品或间接作为动物饲料,谷物都是大多数国家的主要食物。中国盛产稻谷、小麦、玉米、燕麦、高粱等谷物。谷物是人体能量、蛋白质、B 族维生素与矿物质的主要来源,谷物提供人体约 2/3 的能量与蛋白质^[1],其包含的蛋白质还具有重要的功能特性和高营养性。目前,还只有少量谷物蛋白质被加工成浓缩蛋白和分离蛋白,近年来对谷物蛋白的研究越来越多,谷物蛋白不仅在食品中还在免疫活性中^[2]也应用广泛。虽然谷物蛋白是十分复杂和高度异构的^[3],难以提取易于聚集,使之难以定性,但是对这方面

的研究分析已做了大量的工作。许多研究者^[4-5]认为完全的聚集、二硫键促使谷物蛋白不溶于水,如果分离得到高纯度的、没有降解的谷物蛋白形态并了解谷物蛋白的完整特性,就可以研究谷物蛋白的结构并探索出其不易溶于水的原因。

分离纯化技术主要包括蛋白质凝胶电泳(SDS—PAGE)、高效液相色谱(HPLC)、膜过滤、毛细管电泳(CE)及联用技术等。为了深入了解谷物蛋白的特点、结构与功能等完整特性,文章阐述谷物蛋白的组成、特点以及纯化方法的原理、分离模式,并对谷物蛋白分离纯化方法的研究进展进行综述。

1 谷物蛋白质的组成与特点

谷物的化学组成以高淀粉含量、相对重要蛋白质的高含量与相对低的脂类含量为特征。谷物蛋白质含量一般为 7%~15%,据传统的奥斯本—门德尔(Osborne-Mendel)溶解性可分为清蛋白、球蛋白、谷蛋白和醇溶蛋白,不同谷物品种其蛋白质的组成差异很大^[6],几种常见谷物蛋白质的组成见表 1。

谷物蛋白质中,清蛋白和球蛋白主要存在于糊粉层、胚、种皮中,称为代谢蛋白或结构蛋白,是由单链组成的、具有调

表 1 几种常见谷物蛋白质的组成

Table 1 The composition of cereal protein %

谷物	清蛋白	球蛋白	醇溶蛋白	谷蛋白
大米	2~5	2~10	1~5	75~90
高粱	5~10	5~10	55~70	30~40
小麦	5~10	5~10	40~50	30~45
大麦	3~10	10~20	35~50	25~45
米糠	34~40	33~39	19~25	3~8
玉米	2~10	2~10	50~65	30~45
燕麦	5~10	50~60	10~16	5~20

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:31171627);“十二五”国家科技支撑计划项目(编号:2012BAD34B02)

作者简介:唐文娟,女,长沙理工大学在读硕士研究生。

通讯作者:程云辉(1964—),女,长沙理工大学教授,博士。

E-mail:Chengyh6488@sina.com

收稿日期:2015—12—21

控谷物发育过程的^[7]低分子量蛋白质;谷蛋白和醇溶蛋白主要存在于胚乳中,通常也称之为贮藏蛋白,多肽链通过分子间和分子内二硫键连接形成谷蛋白,醇溶蛋白则是由一条单肽链通过分子内二硫键连接而成,这两种蛋白主要决定蛋白质的结构特性和理化特性^[8]。

1.1 大米蛋白质的组成及特点

由表 1 可知,大米蛋白质主要由谷蛋白构成,其含量高达 75%~90%。大米蛋白质具有低过敏性和高营养性的特点。过多的水溶性蛋白会引起人体过敏和面包性哮喘^[9],而大米蛋白中水溶性清蛋白含量仅为 2%~5%,这使其具有非

常低的过敏性;大米蛋白质的高营养性与其氨基酸组成关系密切(见表 2)。大米蛋白质赖氨酸含量(4.0)高于其它谷物蛋白质,氨基酸(AA)组成配比合理,接近 WHO 认定的蛋白质 AA 最佳配比模式,其生物价(BV 值)为 77,蛋白质效用比率(PER 值)为 2.2。但由于大米蛋白质主要含谷蛋白,大分子片断通过二硫键彼此交联,凝聚形成谷蛋白,其在 pH 值 4~10 范围内溶解性差,不溶于酒精、纯水、中性盐溶液,主要是由于两条多肽链 α 链 pI 6.6~7.5,β 链 pI 9.4~10.3,导致其溶解度仅为 3%~8%,制约了大米蛋白质在液态食品工业中的应用。

表 2 几种常见谷物蛋白质的必需氨基酸组成

	Table 2 The amino acid composition of cereal protein									g/100 g
必需氨基酸	Lys	Cys	Met	Ile	Leu	Phe	Tyr	Trp	Val	Thr
大米蛋白	4.0	1.7	2.2	4.1	8.2	5.1	5.2	1.7	5.8	3.5
高粱蛋白	2.3	0.8	2.0	4.3	8.9	4.7	3.2	0.5	6.6	4.7
小麦蛋白	2.5	2.2	2.1	3.6	6.8	4.8	3.2	1.3	4.2	2.9
米糠蛋白	5.7	2.2	1.5	3.1	7.3	6.8	4.1	1.5	5.4	3.5
玉米蛋白	2.0	1.7	1.3	4.2	14.6	3.2	5.2	0.6	5.7	4.1
燕麦蛋白	3.7	2.2	2.4	4.2	7.8	5.6	3.3	0.8	5.5	3.3

1.2 高粱蛋白质的组成及特点

高粱蛋白质主要由醇溶蛋白(55%~70%)和谷蛋白(30%~40%)构成,清蛋白和球蛋白含量较低,因此溶解性也较差。但高粱蛋白质富含人体必需的赖氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸及苯丙氨酸,营养价值较高。营养学分析^[10]表明:高粱蛋白质中必需氨基酸占总氨基酸含量的 41.22%,氨基酸评分(AAS)为 50%,PER 高于 2.0,表现出良好的氨基酸平衡和较高的利用率。高粱蛋白因其含较高的醇溶蛋白和谷蛋白,蛋白成膜过程主要依靠二硫键(S—S)的作用,首先通过 S—S 键裂解成巯基(SH),在溶液中扩散开来,使多肽分子量降低,扩散开的蛋白质分子在空气中被氧化,重新形成二硫键的膜结构,因此可制成可食性薄膜用于水果、蔬菜和坚果类食品的保鲜^[11]。

1.3 小麦蛋白质的组成及特点

小麦蛋白质不是单一的,组分比较复杂。醇溶蛋白(40%~50%)和麦谷蛋白(30%~45%)又被称为面筋蛋白,是小麦蛋白的主要成分,在面团加工品质中起重要作用,蛋白质质量主要由其含量与组成决定。这两种蛋白质构成的小麦面筋蛋白质具有很强的吸水性、黏弹性、薄膜成型性、黏附热凝固性、吸脂乳化性,在食品业中具有广泛的应用价值。

1.4 米糠蛋白质的组成及特点

米糠蛋白质^[4]不同于其它谷物蛋白,其清蛋白(34%~40%)和球蛋白(33%~39%)含量皆较高,其营养价值可与大豆蛋白相媲美,米糠蛋白质中的必需氨基酸种类齐全,8 种人体必需氨基酸均衡,相互比例适宜,Lys、Thr、Trp 含量较高,尤其是高含量的 Lys 补偿了谷物蛋白普遍存在的赖氨酸不足的缺陷,营养价值大大提升,其蛋白质功效比为 1.59~2.04。

1.5 玉米蛋白质的组成及特点

玉米蛋白质^[12]中醇溶蛋白(50%~65%)和谷蛋白(30%~45%)含量较高。玉米醇溶蛋白是一种理想的天然保鲜剂,能形成柔软、透明、均匀的保鲜薄膜,具有较强的韧性、保水性、保油性及能吸收紫外光等特点^[13],具有防止食品成分氧化、风味散失及失水等作用。利用玉米蛋白质粉可提取天然食用色素、玉米醇溶蛋白和谷氨酸等物质,还可制备出具有多种生理功能的谷氨酰胺肽、高 F 值低聚肽与降压肽等,可大幅度提升玉米蛋白质的附加值。

1.6 燕麦蛋白质的组成及特点

在所有谷物蛋白质中,燕麦蛋白质^[14]的球蛋白含量最高(50%~60%),具有较好的溶解性。燕麦蛋白质富含 8 种必需 AA,其中具有极高含量的限制性 AA Lys 和 Trp,且其配比接近 FAO/WHO 推荐的模式,燕麦蛋白质净利用率(NPU)高达 69.1~72.4,PER 达 2.25~2.38,AAS 高达 68.2,BV 为 74.5~79.6,均领先其他植物蛋白质。

2 谷物蛋白质的分离纯化

物理、化学性质及生理功能的差异是蛋白质分离纯化的基础,因此可根据蛋白质大小、形状、电荷、疏水性 with 功能活性的差异对其进行分离纯化^[15]。为了更清楚地了解谷物蛋白质的功能性质与其结构的关系,众多学者利用膜分离、SDS—PAGE、反相高效液相色谱 RP—HPLC、高效毛细管电泳 HPCE 等开展了谷物蛋白质分离纯化的研究。

2.1 小麦蛋白质的分离纯化

对小麦蛋白质中醇溶蛋白和谷蛋白分离纯化的研究报道主要集中在 RP—HPLC、CE 和 SDS—PAGE 法等。赵龙刚等^[16]采用 RP—HPLC 分离小麦胚乳醇溶蛋白(gliadin),

研究了洗脱时间、柱温、流速、洗脱梯度对分离效果的影响,确定了适宜 Gliadin RP—HPLC 分离的最佳条件:流速 1 mL/min,柱温 60 ℃,波长 210 nm,该条件下可得到 23~46 个组分峰。晏月明等^[17]利用毛细管区带电泳考察了小麦种子醇溶蛋白在不同电泳条件下的分离效果,结果表明,在 15 kV 电压和 30 ℃ 的条件下用碱性缓冲液可获得较高的分辨率和重复性,鲁麦 1 号峰的数量多达 40 个以上,5 次重复分离试验分析显示各个峰迁移时间最大偏差在 0.03 min 内,15 个主峰的 RSD 为 0.25%。Naeem H A 等^[18]使用多孔性固定相分离小麦蛋白,柱温 65 ℃ 时采用 23%~44% ACN 浓度梯度,流速 0.7 mL/min,14 min 内 HMW 和 LMW 麦谷蛋白都达到最高分辨率。Gao Li-yan 等^[19]利用 HPCE 法从 3 种不同的小麦品种中成功分离了高分子量谷蛋白亚基 HMW-GS,所有亚基在 14 min 内都得到分离,比 RP—HPLC 更快速。Schober T J 等^[20]利用 SEC—HPLC 色谱法分析了在蠕变试验、弹性振动和面筋的膨胀能力试验中 25 个小麦品种谷蛋白质量及含量,相关系数表明,不溶性聚合蛋白是形变的阻力,麦醇溶蛋白有相反的影响,而水溶性聚合蛋白(SPP)的作用取决于测试类型。

反相高效液相和电泳法多用于小麦蛋白质中清蛋白和球蛋白的分离。Yu Zi-tong 等^[5]利用 RP—UPLC 快速分离和鉴定了小麦中的水溶性蛋白,并且与传统的 RP—HPLC 分析进行了比较,得到高分辨率、高重现性的结果,11 次重复试验 18 个蛋白组分峰的保留时间相对标准偏差(RSD)非常低,在 0.25%~1.25%,峰高和峰面积的 RSD 分别小于 2%和 3%。Morel M H 等^[21]研究了小麦面粉蛋白质常温超声处理之后采用 SEC—HPLC 分离的效果,结果发现,超声能量(时间×功率增量)为 3 000 (s·W)时,小麦蛋白提取率可达到 100%,而且提取效果与面粉蛋白质含量显著相关。张锐昌等^[22]利用 Tricine—SDS—PAGE 电泳对小麦蛋白酶解物的分子量分布进行研究,结果表明胃蛋白酶酶解物中多肽物质的分子量主要集中在 3.83~7.47 kU;碱性蛋白酶酶解物中多肽物质的分子量主要集中在 4.63~8.56 kU。

2.2 大米蛋白质的分离纯化

目前关于大米蛋白质纯化方法的研究主要集中在米渣蛋白,已报道的粗提纯方法有碱提酸沉法^[23]、水洗法、酶解法(淀粉酶法、纤维素酶法、蛋白酶解法)^[24]。由于其低的溶解度,及蛋白分子大小、组成、结构等的多样性,使得大米蛋白的精细分离纯化技术成为制约进一步研究其结构与功能的关键。

Oszvald M 等^[25]通过超声处理得到的大米蛋白粉经过 SE—HPLC 分离获得 4 个组分,该组分进一步进行 SDS—PAGE 分离鉴定,结果表明组分 1~3 主要是谷蛋白、组分 4 包含清蛋白、球蛋白和醇溶蛋白,方勇等^[26]通过水提、盐提、碱提和醇提方法提取大米含硒蛋白,纯化后蛋白富硒量从小到大依次为:清蛋白<醇溶蛋白<球蛋白<碱溶谷蛋白。利用体积排阻色谱—电感耦合等离子体质谱(SEC—HPLC—ICP—MS)联用技术分析含硒蛋白,结果表明,硒主要存在

于>7 kDa 的碱溶谷蛋白和球蛋白中,其中碱溶含硒蛋白主要组分 F1 分子量为 199.8 kDa。刘珊珊等^[27]采用 Sephadex G-75 纯化大米蛋白,SDS—PAGE 鉴定目标大米镉结合蛋白组分 b 为均一组分,分子量约为 32 kDa。

2.3 高粱蛋白质的分离纯化

高粱蛋白提取工艺主要包括萃取、离心、沉淀、水洗和烘干等步骤,主要利用其溶解性、等电点、盐析和酸沉等性质。对于高粱蛋白的分离纯化主要集中于醇溶蛋白,Blackwell D L 等^[28]报道了用 SDS—PAGE 分离高粱醇溶蛋白时,由于其高度异质性,分辨率低,因此使用基于电荷分离的 IE—HPLC 技术,最优条件下高粱醇溶蛋白成功分离得到 10 个组分。Bean S R 等^[29]利用表面多孔型的 RP—HPLC 色谱柱分离了高粱蛋白,使用 C₃、C₈、C₁₈ 表面多孔型固定相在 17 min 内成功分离了高粱蛋白,相关系数为 $r^2=0.96$ 。

2.4 其它谷物蛋白质的分离纯化

其他谷物蛋白质如大麦蛋白、玉米蛋白、燕麦蛋白、小米米糠蛋白常用 HPLC 法、电泳法、膜过滤方法进行分离纯化。Celus I 等^[30]利用 RP—HPLC—C₈ 柱将大麦蛋白提取物分离成 3 个不同的组分;刘宝祥等^[31]以不同品种的中国产酿造大麦为研究对象,应用 2D 电泳技术对其蛋白质组成进行了差异性分析,找到了不同品种酿造大麦蛋白组成的差异,主要差异蛋白质点有 6 个,分子量在 43~66 kDa,等电点在 6.5 左右。Rodriquez-Nogales 等^[32]优化提取条件和梯度使用灌注固定相分离玉米蛋白,在 4 min 内将样品分离成 7~9 个峰;还用整体式固定相在 8~10 min 内将玉米蛋白分离成 9~12 个峰^[33]。Nieto-Nieto T V 等^[34]利用 Agilent 1200 series 型 SE—HPLC,将燕麦蛋白分成主要的 3 个部分 656~22.4 kDa,21.4~0.4 kDa、< 0.4 kDa。张晓平等^[35]利用中空纤维膜分离燕麦蛋白,研究超滤方式对中空纤维膜 MOF503 处理燕麦蛋白提取液的影响,分批超滤方式下,总糖清除率、膜的污染度、浓缩效率分别为 77.6%、39%、41.6 L/(m²·h),连续超滤方式下,总糖清除率、膜的污染度、浓缩效率分别为 61.2%、54.3%、24.5 L/(m²·h),确定分批超滤要比连续超滤效果好。Klose C 等^[36]用毛细管电泳研究了磨碎燕麦的组成变化,结果观察到在球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白中有降解的小分子肽和氨基酸;清蛋白组分增加。单树花等^[37]通过多种方法对小米米糠蛋白进行逐步分离纯化,利用 MTT 法与丙酮沉淀、(NH₄)₂SO₄ 沉淀、Q 阴离子交换柱、SP 阳离子交换柱、蛋白热变性法相结合,纯化出小米米糠中抗肿瘤活性蛋白(FMB),FMB 能显著诱导癌细胞凋亡,但对正常细胞没有明显影响。He Xuan-hui 等^[38]利用 SDS—PAGE 分离了未经处理和经高压处理的花生分离蛋白,结果表明高压处理会导致伴花生球蛋白的聚集。

2.5 混合谷物蛋白质的分离纯化及联用分离技术

1998 年就有采用高效毛细管电泳分离小麦、燕麦和大米等混合谷物蛋白质的研究报道^[39]。Castro-Rubio 等^[40]利用灌注 RP—HPLC 实现了大豆蛋白质和小麦、大米和玉米等谷物蛋白质的快速、同时分离。Bietz J A^[41]则通过 RP—

HPLC 体系 C₁₈ 柱对来源于小麦和玉米中的低分子量麦醇溶蛋白、Ω-麦醇溶蛋白和醇溶性谷蛋白亚基实现了有效分离，其中低分子量麦醇溶蛋白得到 36 个组分，Ω-麦醇溶蛋白得到 25 个组分，分子量集中在 6 500~80 000 Da，醇溶性谷蛋白亚基分离得到 23 个组分。谷物蛋白具有相似性，种类多，有时单一的分离纯化手段达不到理想效果，联用分离技术在谷物蛋白分离纯化中已显示出一定的优越性，Bean S R 等^[42]将毛细管区带电泳(FZCE)与 RP—HPLC 相结合，对小麦谷蛋白进行两向分离，蛋白首先经过 RP—HPLC 分离，自动收集器收集的组分进行下一步 FZCE 分离，研究结果表明，在 2D 色谱图上，很容易找到谷蛋白亚基的聚集区，且重现性好，3 次试验保留时间 RSD 仅约 1%。

3 展望

随着高效液相色谱法、毛细管电泳法和蛋白质凝胶电泳法等分离纯化方法在谷物蛋白质分离纯化中的广泛应用，谷物蛋白质分离纯化在一定程度上变得更快速、分辨率更高。但很多方法还处于探索阶段，可从以下几方面进行完善和发展：谷物蛋白普遍溶解较差，可先对其进行预处理以改善溶解性，再进一步进行分离纯化；高效液相色谱分离纯化工艺成本较高，目前仅限于实验室规模的应用，且因蛋白质的多样性，在用高效液相色谱分离纯化不同种类蛋白时，如何保持蛋白活性、如何选择固定相材料、洗脱液种类也是需要研究的重要内容；分离纯化过程对谷物蛋白营养、功能性质及生物活性是否有影响？谷物中含有多种活性成分如：葡聚糖、蛋白质、脂质等，研究联合技术分离多组分，实现谷物综合利用。

参考文献

[1] 何国卿, 李庆龙, 李江其, 等. 全谷物杂粮米及其发展前景初探[J]. 农业机械, 2012(6): 26-29.

[2] 邱伟芬, 罗佩竹, 方勇, 等. 大米源硒代多肽的酶法制备及其抗氧化活性的研究[J]. 中国粮油学报, 2013(4): 1-7.

[3] Castro-Rubio A, García M C, Marina M L. Rapid separation of soybean and cereal (wheat, corn, and rice) proteins in complex mixtures: Application to the selective determination of the soybean protein content in commercial cereal-based products[J]. Analytica Chimica Acta, 2006, 558(1): 28-34.

[4] Schmitt C, Bovay C, Rouvet M, et al. Whey protein soluble aggregates from heating with NaCl: physicochemical, interfacial, and foaming properties[J]. Langmuir, 2007(23): 4 155-4 166.

[5] Wang Xian-sheng, Tang Chuan-he, Li Bian-sheng, et al. Effects of high-pressure treatment on some physicochemical and functional properties of soy protein isolates[J]. Food Hydrocolloids, 2008(22): 560-567.

[6] 梁彬霞, 朱豪. 谷物蛋白的结构功能及开发特性的研究进展[J]. 农产品加工·学刊(下), 2013(6): 63-65.

[7] Yu Zi-tong, Han Cai-xia, Wang Shu, et al. Fast separation and characterization of water-soluble proteins in wheat grains by reversed-phase ultra performance liquid chromatography (RP-UP-LC)[J]. Journal of Cereal Science, 2013, 57(3): 288-294.

[8] 王章存, 康艳玲. 国内外谷物蛋白发展概况[J]. 中国食品添加剂, 2006(5): 110-113.

[9] Amano M, Ogawa H, Kojima K, et al. Identification of the major allergens in wheat flour responsible for baker's asthma[J]. Biochemistry Journal, 1998, 330(3): 1 229-1 234.

[10] 杜金娟, 吴琼英, 贾俊强. 甜高粱蛋白的氨基酸组成和营养学评价[J]. 食品工业, 2013(7): 143-146.

[11] 杜传来, 王佳红, 周娴, 等. 可食性膜及其在果蔬保鲜中的应用[J]. 包装与食品机械, 2004, 22(1): 46-49.

[12] 林峰, 蔡木易, 易维学. 玉米蛋白深加工现状及发展趋势[J]. 食品与发酵工业, 2007, 32(11): 123-127.

[13] 赵文扬, 康明丽, 王蕾娜, 等. 玉米蛋白粉的综合利用[J]. 食品工程, 2014(2): 3-5.

[14] 刘建奎, 张玲, 郝利平. 燕麦蛋白提取分离的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2014(1): 132-136.

[15] 张淑红, 冯硕, 李正平, 等. 高效液相色谱(HPLC)分离和检测蛋白质[J]. 河北农业大学学报, 2003(z1): 148-151.

[16] 赵龙刚, 宋希云, 史雪辉, 等. 小麦胚乳醇溶蛋白反相高效液相色谱(RP—HPLC)分离方法的建立[J]. 现代仪器, 2006(6): 78-80.

[17] 晏月明, 刘广田. 毛细管区带电泳分离小麦种子醇溶蛋白的研究[J]. 色谱, 1998(3): 68-70.

[18] Naeem H A, Sapirstein H D. Ultra-fast separation of wheat glutenin subunits by reversed-phase HPLC using a superficially porous silica-based column[J]. J. Cereal Sci., 2007(46): 157-168.

[19] Gao Li-yan, Ma Wu-jun, Chen Jing, et al. Characterization and comparative analysis of wheat high molecular weight glutenin subunits by SDS—PAGE, RP—HPLC, HPCE, and MALDI—TOF—MS[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(5): 2 777-2 786.

[20] Schober T J, Bean S R, Kuhn M. Gluten proteins from spelt (Triticum aestivum ssp. Spelta cultivars: A rheological and size-exclusion high-performance liquid chromatography study[J]. Journal of Cereal Science, 2006, 44(2): 161-173.

[21] Morel M H, Dehlon P, Autran J C, et al. Effects of temperature, sonication time, and power settings on size distribution and extractability of total wheat flour proteins as determined by size-exclusion high-performance liquid chromatography[J]. Cereal Chemistry, 2000, 77(5): 685-691.

[22] 张锐昌, 王绮, 张应龙, 等. Tricine—SDS—PAGE 测定小麦蛋白酶解物分子量分布[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(12): 168-171.

[23] Frederick F, Kim D. Preparation and characterization of rice protein isolations[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2000, 77(8): 268-272.

[24] 葛娜, 易翠平, 姚惠源. 碱性蛋白酶提取大米水解蛋白的研究[J]. 粮食与饲料工业, 2006(4): 25-27.

[25] Oszvald M, Tömösközi S, Larroque O, et al. Characterization of rice storage proteins by SE—HPLC and micro z-arm mixer[J]. Journal of Cereal Science, 2008, 48(1): 68-76.

[26] 方勇, 杨文建, 马宁, 等. 体积排阻色谱—电感耦合等离子体质谱分析富硒大米含硒蛋白组成[J]. 分析化学, 2013, 41(6):

882-887.

[27] 刘珊珊, 陈季旺, 陈露, 等. 大米镉结合蛋白的凝胶层析纯化及生化性质[J]. 食品安全质量检测学报, 2015(6): 2 269-2 274.

[28] Blackwell D L, Bean S R. Separation of alcohol soluble sorghum proteins using non-porous cation-exchange columns[J]. Journal of Chromatography A, 2012, 230(1): 48-53.

[29] Bean S R, Iorger B P, Blackwell D L. Separation of kafirins on surface porous reversed-phase high-performance liquid chromatography columns[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 59(1): 85-91.

[30] Celus I, Brijs K, Delcour J A. The effects of malting and mashing on barley protein extractability[J]. Journal of Cereal Science, 2006, 44(2): 203-211.

[31] 刘宝祥, 朴永哲, 苏政波, 等. 不同国产酿造大麦蛋白质双向电泳差异性分析[J]. 作物杂志, 2013(6): 23-26.

[32] Rodriquez-Nogales J M, Garcia M C, Marina M L. Development of a perfusion reversed-phase high performance liquid chromatography method for the characterization of maize products using multivariate analysis[J]. J. Chromatogr. A, 2006, 104(1): 91-99.

[33] Rodriquez-Nogales J M, Garcia M C, Marina M L. Monolithic supports for the characterization of commercial maize products based on their chromatographic profile. Application of experimental design and classification techniques[J]. J. Agric. Food Chem. , 2006(54): 1 173-1 179.

[34] Nieto-Nieto T V, Wang Yi-xiang, Ozimek L, et al. Effects of partial hydrolysis on structure and gelling properties of oat globular proteins[J]. Food Research International, 2014(55): 418-425.

[35] 张晓平, 董银卯, 刘永国, 等. 中空纤维膜分离燕麦蛋白工艺及膜清洗方案[J]. 农业工程学报, 2010, 3(3): 332-340.

[36] Klose C, Schehl B D, Arendt E K. Fundamental study on protein changes taking place during malting of oats[J]. Journal of Cereal Science, 2009, 49(1): 83-91.

[37] 单树花, 武海丽, 李宗伟, 等. 小米米糠中抗癌细胞增殖活性蛋白的分离纯化[J]. 食品科学, 2013, 34(9): 296-300.

[38] He Xuan-hui, Liu Hong-zhi, Liu Li, et al. Effects of high pressure on the physicochemical and functional properties of peanut protein isolates[J]. Food Hydrocolloids, 2014(36): 123-129.

[39] Bean S R, Bietz J A, Lookhart G L. High-performance capillary electrophoresis of cereal proteins[J]. Journal of Chromatography A, 1998, 814(1): 25-41.

[40] Castro-Rubio A, García M C, Marina M L. Rapid separation of soybean and cereal (wheat, corn, and rice) proteins in complex mixtures: Application to the selective determination of the soybean protein content in commercial cereal-based products[J]. Analytica Chimica Acta, 2006, 558(1): 28-34.

[41] Bietz J A. Separation of cereal proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 1983(255): 219-238.

[42] Bean S R, Lookhart G L. Separation of wheat proteins by two-dimensional reversed-phase high-performance liquid chromatography plus free zone capillary electrophoresis 1[J]. Cereal Chemistry, 1997(74): 758-765.

(上接第 177 页)

[62] Nagatani N, Takeuchi A, Hossain M A, et al. Rapid and sensitive visual detection of residual pesticides in food using acetylcholine esterase-based disposable membrane chips[J]. Food Control, 2007, 18(8): 914-920.

[63] 邱朝坤, 刘晓宇, 任红敏, 等. 酶抑制法检测蔬菜中有机磷农药残留[J]. 食品与机械, 2010, 26(2): 40-42.

[64] Alina C I, Ion I, Alina C, et al. Acetylcholinesterase voltammetric biosensors based on carbon nanostructurechitosan composite material for organophosphate pesticides[J]. Materials Science and Engineering C, 2010, 30: 817-821.

[65] 武中平, 徐春祥, 高巍, 等. 酶联免疫分析法及其在食品农药残留检测中的应用[J]. 江苏农业科学, 2007(1): 198-201.

[66] Dalvie M A, Sinanovic E, London L, et al. Cost analysis of ELISA, solid-phase extraction, and solid-phase microextraction for the monitoring of pesticides in water[J]. Environmental Research, 2005, 98(1): 143-150.

[67] Joshi K A, Tang J, Haddon R, et al. A disposable biosensor for organophosphorus herve agents based on carbon nanotubes modified thick film strip electrode[J]. Electroanalysis, 2005, 17(1): 54-58.

[68] Wang Lei, Zhang Li-jie, Li Wei, et al. Determination of organophosphorus pesticides based on biotin-avidin enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2011, 39(3): 346-350.

[69] Qian Guo-liang, Wang Li-ming, Wu Yun-ru, et al. A monoclonal antibody-based sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the analysis of the organophosphorous pesticides chlorpyrifos-methyl in real samples[J]. Food Chemistry, 2009, 117(2): 364-370.

[70] 韩波, 姚安庆, 王勇, 等. 应用植物酯酶测定农药残留研究进展[J]. 长江大学学报: 自然科学版, 农学卷, 2009, 6(3): 60-65.

[71] 王莉, 李锋, 姚冰, 等. 以 DTNB 为电子媒介检测农产品中甲拌磷残留的生物传感法的建立[J]. 食品科技, 2010(12): 312-315.

[72] Kumaravel A, Chandrasekaran M. A novel nanosilver/nafion composite electrode for electrochemical sensing of methyl parathion and parathion[J]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2010, 638(2): 231-235.

[73] Kumaravel A, Chandrasekran M. A biocompatible nano TiO₂/nafion composite modified glassy carbon electrode for the detection of fenitrothion[J]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2011, 650(2): 163-170.

[74] 伍周玲, 燕冰宇, 梁东军, 等. 新型固载酶生物传感器制备及食品中有机磷农药检测[J]. 中国食品学报, 2015, 15(3): 166-173.